



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

27 SEP 2004

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

02006978.7

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Anmeldung Nr:
Application no.: 02006978.7
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 27.03.02
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Micronas GmbH
Hans-Bunte-Strasse 19
79108 Freiburg
ALLEMAGNE
Klaproth, Holger, Dr.
Kehlerstrasse 12
79108 Freiburg
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se referer à la description.)

Verfahren und Vorrichtung zur Detektion von zellulären Vorgängen mittels
Lumineszenzmessung

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)
revendiquée(s)
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

DE/18.07.01/DE 10133844

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

G01N33/00

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE TR

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Verfahren und Vorrichtung zur Detektion von zellulären Vorgängen mittels
Lumineszenzmessungen

EPO - Munich
22

27. März 2002

5 Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur ortsspezifischen Detektion eines Lumineszenzereignisses in oder an oder in der unmittelbaren Umgebung einer zur analysierenden Zelle oder Zellverband oder Gewebe gemäß dem Oberbegriff des Patentanspruchs 1. Ferner betrifft die Erfindung ein entsprechendes Verfahren gemäß dem Oberbegriff des Patentanspruchs 10.

10

Es handelt sich dabei allgemein um ein Verfahren sowie eine Vorrichtung zur optophysikalischen Detektion von Analyten in oder an oder in der unmittelbaren Umgebung von Zellen. Aufgrund der Erfindung wird die Miniaturisierung vorbekannter Systeme, bei denen die Detektion eines Analyten durch Lumineszenzmessung erfolgt,

15 erreicht.

Bevorzugte Ausführungsbeispiele sind in den Unteransprüchen offenbart.

Zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis des Vorhandenseins von bestimmten

20 Substanzen wie z.B. Biomolekülen in einer zu analysierenden Probe ist die Verwendung von im wesentlichen planaren Systemen bekannt, welche in der Fachwelt als Biosensoren bzw. Biochips bezeichnet werden. Diese Biochips bilden einen Träger, auf dessen Oberfläche i.d.R. eine Vielzahl von zumeist rasterartig angeordneten Detektionsbereichen ausgebildet ist, wobei sich die einzelnen Bereiche bzw. Bereichsgruppen jeweils durch ihre

25 Spezifität gegenüber einem bestimmten nachzuweisenden Analyten voneinander unterscheiden. Im Falle von nachzuweisenden DNA-Analyten befinden sich innerhalb der einzelnen Bereiche der Trägeroberfläche – direkt oder indirekt immobilisiert – spezifische Nukleinsäuresonden wie z.B. Oligonukleotide oder cDNA in zumeist einzelsträngiger Form, deren jeweilige Spezifität gegenüber der nachzuweisenden Nukleinsäure im

30 wesentlichen durch die Sequenzabfolge (Sondendesign) vorgegeben ist. Die auf diese Weise funktionalisierte Chipoberfläche wird im Rahmen eines entsprechenden Nachweisverfahrens mit der die nachzuweisenden DNA-Analyten möglicherweise

enthaltenden Probe unter Bedingungen in Kontakt gebracht, welche im Falle des Vorhandenseins der zuvor nachweisbar markierten Zielnukleinsäure(n) deren Hybridisierung mit den immobilisierten Sondenmolekülen gewährleisten. Die qualitative

5 und ggf. quantitative Detektion eines bzw. mehrer spezifisch gebildeter Hybridisierungs-
komplexe erfolgt anschließend zumeist durch optophysikalische Lumineszenzmessung und
Zuordnung der erhaltenen Daten zu den jeweiligen Detektionsbereichen, wodurch die

Bestimmung der Anwesenheit des bzw. der DNA-Analyten in der Probe und ggf. deren

10 Quantifizierung ermöglicht wird.

Die meisten zellulären Analysen werden auf Basis von Objekträgern fixierten Zellen
durchgeführt. Die Analyse lebender Zellen findet zumeist in Zellkulturschalen statt.
Entsprechend geeignete Zellkulturschalen werden z.B. von der Firma NUNC angeboten.

15 Vor allem die Untersuchung von Stoffwechselvorgängen an lebenden Zellen ist von
besonderem Interesse, da damit z.B. der Einfluß eines neuen potentiellen Medikamentes
beobachtet werden kann. Eine häufig durchgeführte Messung ist die intrazelluläre
Kalziumbestimmung mittels kalziumsensitiver Farbstoffe, z.B. Fura II.

20 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird darauf hingewiesen, dass die
zugrundeliegende Technologie selbstverständlich auch für die Detektion anderer
nachweisbar markierter Analyte wie insbesondere proteinöse Substanzen (Peptide,
Proteine, Antikörper, funktionelle Fragmente derselben) eingesetzt werden kann, sofern die
Nachweisreaktion auf der Messung von Lumineszenzdaten beruht. Mit anderen Worten
25 betrifft die vorliegende Erfindung jedweden lumineszenzgestützten Nachweis eines aus
einem nachweisbar markierten Molekül, -atom, -ion in, an oder in unmittelbarer Umgebung
einer lebenden Zelle, wobei erfindungsgemäß auch solche Systeme umfasst sind, bei denen
sich Zellbestandteile bereits durch eine nachweisbare Eigenfluoreszenz auszeichnen und
daher keiner weiteren Markierung bedarf. So ist beispielsweise bekannt, dass
30 Pflanzenzellen nach einer Bestrahlung noch bis in den Minutenbereich nachleuchten.

Unter dem Begriff „Lumineszenz“ werden erfundungsgemäß sämtliche, durch eine Anregungsquelle hervorgerufene Lichtemissionen (im weiteren Sinne auch die Aussendung von ultravioletter und infraroter Strahlung) von gasförmigen, flüssigen und festen Stoffen

5 zusammengefasst, die nicht durch hohe Temperaturen, sondern durch vorangegangene Energieabsorption und Anregung verursacht wird. Die Lumineszenz zeigenden Stoffe werden Luminophore genannt. Auch wenn die vorliegende Erfindung z.T. unter Verwendung der Begriffe „Fluoreszenz“ und „Fluorophore“ näher erläutert wird, kennzeichnen diese Begriffe lediglich bevorzugte Ausführungsformen des erfinderischen

10 Grundgedankens und stellen somit keine Beschränkung der Erfindung dar.

Wie dem Fachmann bekannt ist, kann eine Lumineszenz hervorgerufen werden durch Bestrahlung aus einer Anregungsquelle mit Licht (vorzugsweise kürzerwelliges Licht sowie Röntgenstrahlen, Photolumineszenz), mit Elektronen (Kathodolumineszenz), Ionen

15 (Ionolumineszenz), Schallwellen (Sonolumineszenz) oder mit radioaktiven Stoffen (Radiolumineszenz), durch elektrische Felder (Elektromineszenz), durch chemische Reaktionen (Chemolumineszenz, Biolumineszenz) oder mechanische Vorgänge (Tribolumineszenz). Demgegenüber handelt es sich bei der Thermolumineszenz um durch Erwärmung ausgelöste oder verstärkte Lumineszenz. Alle diese Prozesse unterliegen den

20 allgemeinen Grundsätzen der Quantenmechanik und bewirken eine Anregung der Atome und Moleküle, die anschließend unter Emission von Licht, welches erfundungsgemäß detektiert wird, in den Grundzustand zurückkehren. Die Auswahl und ggf. unterschiedliche Ausführung geeigneter Anregungsquellen ist demnach davon abhängig, welche(r) Typ(en) der Lumineszenzerzeugung angewendet werden soll(en). Folglich kann die

25 Anregungsquelle z.B. in Form von Elektroden, Leuchtdioden, Ultraschallschwingern etc. vorgesehen sein.

Die auf lumineszenzgestützten Nachweis basierenden und im Stand der Technik bekannten Systeme umfassen neben dem eigentlichen mit Zellen bestückten Objektträger

30 insbesondere Vorrichtungen zur Erfassung, Weiterleitung und Auswertung der

lumineszenzbedingten Signale. Die am Markt befindlichen Produkte sind jedoch aufgrund der Anzahl der erforderlichen Systemkomponenten sowie einer damit verbundenen hohen Komplexität relativ teuer und können im wesentlichen nicht mehr weiter miniaturisiert

5 werden. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher die Bereitstellung neuer Vorrichtungen der zuvor beschriebenen Art, mit denen die Nachteile der im Stand der Technik bekannten Systeme überwunden werden.

Gegenüber den vorbekannten Nachweissystemen, bei denen der lumineszenzgestützte

10 Nachweis des Vorhandenseins eines Analyten in einer Zelle durch Verwendung komplexer Abbildungsoptiken wie CCD-Kameras erfolgt, basiert die vorliegende Erfindung darauf, dass diese aufwändigen Abbildungsoptiken durch integrierte Mittel für ein direktes Bildaufnahmeverfahren ersetzt werden.

15 Seit langem ist bekannt, dass die Sensitivität und damit die untere Nachweigrenze entsprechender Systeme durch eine den Werkstoffkomponenten inhärente Eigenfluoreszenz sowie durch systembedingte Lichtstreuungen eingeschränkt werden. Bestrebungen der Technik, das hierdurch verursachte Hintergrundrauschen zu minimieren bzw. ein optimiertes Verhältnis zwischen Signal und Rauschen zu erhalten, haben u.a. zur 20 Technologie der zeitaufgelösten bzw. zeitverzögerten (time-resolved) Fluoreszenzmessung geführt, welche in verschiedenen Anwendungsgebieten bereits mit Erfolg angewendet wird.

Das allgemeine Prinzip der zeitaufgelösten fluorimetrischen Messung ist wie folgt: Im

25 Falle der Anregung einer Mischung von Fluoreszenzverbindungen mit einem kurzen Lichtpuls aus einem Laser oder aus einer Blitzlichtlampe emittieren die angeregten Moleküle eine entweder kurz- oder langandauernde Fluoreszenz. Obgleich beide Typen der Fluoreszenzabnahme exponentiell verlaufen, klingt die kurzlebige Fluoreszenz innerhalb weniger Nanosekunden auf einen vernachlässigbaren Wert ab. Sofern Messungen während 30 dieser kurzen Dauer nach erfolgter Anregung im wesentlichen unterbleiben, werden sämtliche Hintergrundsignale aus der kurzlebigen Fluoreszenz sowie sämtliche durch

Streuung bedingten Strahlungsimpulse eliminiert, wodurch die lang andauernden Fluoreszenzsignale mit sehr hoher Sensitivität gemessen werden können.

- 5 Die für diese Erfindung besonders geeigneten Luminophore sind solche, deren Halbwertszeit deutlich über 5 ns liegt, so dass diese Luminophore nach dem Abklingen des sog. Fluoreszenzhintergrundes (s.o.) noch messbar sind. Am meisten bevorzugt sind Luminophore, deren Halbwertzeiten im μ s- bis ms-Bereich, insbesondere im Bereich zwischen 100 μ s und 2000 μ s liegen. Dementsprechend werden die Messungen im
- 10 Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens im allgemeinen nach Verstreichen einer Zeitdauer von ca. 5 ns nach erfolgter Anregung durchgeführt. Nach einer bevorzugten Ausführungsform liegt das Messfenster im μ s- bis ms-Bereich, wobei der Bereich zwischen 100 μ s und 2000 μ s besonders bevorzugt ist.
- 15 Organische Luminophore weisen meist nur eine kurze Halbwertszeit des angeregten Zustandes auf. Dieser, Fluoreszenz i.e.S. genannte Effekt beruht auf der durch die Energie der Anregungsquelle verursachten Anhebung eines Elektrons auf eine höhere Vibrationsenergieebene, den sog. angeregten Singulettzustand. Dieser Zustand weist eine Stabilität von nur wenigen ns auf (z.B. 2,6 ns für Tryptophan). Beim Rückfall des
- 20 Elektrons aus dem angeregten Singulettzustand in den Grundzustand wird dabei die Anregungsenergie in Form von Licht frei. Die Emissions-Wellenlänge ist dabei in der Regel größer als diejenige der Anregungsquelle. Die Differenz zwischen Anregungswellenlänge und Emissionswellenlänge nennt man Stokes-Verschiebung. Bei einigen Luminophoren findet dagegen ein Übergang des angeregten Singulettzustandes in
- 25 den sog. Tripletzustand statt. In diesem Falle kommt es zu einer Stabilisierung des angeregten Zustandes und zu einer Vergrößerung der Stokes-Verschiebung. Dieser Tripelitzustand befindet sich in der Regel auf einem Energieniveau unmittelbar unter demjenigen des angeregten Singulettzustandes. Im Tripletzustand liegt keine Spinpaarung des Elektrons mit dem Grundzustand des Elektrons mehr vor. Somit handelt es sich bei dem
- 30 Übergang vom Tripletzustand in den Grundzustand um einen quantenmechanisch verbotenen Übergang. Dadurch wird die Lebensdauer des angeregten Zustandes stabilisiert. Dieser Effekt wird Phosphoreszenz genannt und weist Halbwertszeiten bis zu

10 ms auf. Klassische Luminophore mit langer Halbwertzeit sind z.B. Verbindungen von Seltenen Erden Metallen (SEE) oder Aktinidenverbindungen, wobei letztere jedoch wegen ihrer Radioaktivität nur noch eine untergeordnete Rolle spielen. In der Biologie werden

5 SEE-Metallionen meist als Chelatorkomplexe verwendet, da durch die Wahl eines geeigneten organischen Bindungspartners die Lumineszenzausbeute drastisch erhöht werden kann. Solche Verbindungen sind kommerziell als sogenannte „Microspheres“ mit einem Durchmesser von mehreren Hundert nm erhältlich (z.B. FluoSpheres® Europium Luminescent Microspheres, Molecular Probes).

10

Weiterhin zur erfindungsgemäßen Verwendung bevorzugt geeignet sind Nanokristalle von Halbleitern, da sie neben ihren Lumineszenzeigenschaften insbesondere eine relativ kleine Größe (wenige nm) und eine hohe Stabilität (kein Photobleaching) aufweisen. Die Halbwertszeit kann hier in Abhängigkeit von dem gewählten Halbleitermaterial und der

15

Dotierung in einem weiten Bereich von mehreren Hundert ns bis hin in den Millisekundenbereich eingestellt werden. Entsprechende Nanopartikel können vom Fachmann leicht mit z.B. Silanen beschichtet (s. z.B. Bruchez et. al., Science 281, 2013-2016(1998)) und anschließend an organische Moleküle wie z.B. Nukleinsäuren oder

20 Antikörper gekoppelt werden. Geeignete Halbleiter sind Halbleiter der Klassen II-VI (MgS, MgSe, MgTe, CaS, CaSe, CaTe, SrS, SrSe, SrTe, BaS, BaSe, BaTe, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe, HgS, HgSe, HgTe), III-V (GaAs, InGaAs, InP, InAs), und IV (Ge, Si). Derart beschaffene Halbleiter-kristalle weisen Halbwertzeiten im Bereich von ca. 200 ns oder mehr auf. Nanokristalle der Klasse II-VI sind z.B. als sogenannte „Quantum Dots“

25 (Quantum Dot Corp., Kalifornien, USA) erhältlich. Das jeweilige Absorptionsspektrum von Nanokristallen innerhalb einer Klasse ist identisch, die jeweiligen Emissionsspektren unterscheiden sich jedoch in Abhängigkeit der gegebenen Partikelgröße, so dass bei der Verwendung von Filteroptiken mehrere parallele Markierungen unter Verwendung einer Anregungswellenlänge gemessen werden können. Die Eigenschaften einiger Nanokristalle

30 ergeben sich aus Tabelle 1.

Tabelle 1

Nanokristalle	Größe	Extinktion	Emission
CdSe-CdS	2,4 nm	350-450 nm	533 nm
CdSe-CdS	4,6 nm	350-450 nm	630 nm
ZnS Mn ²⁺ dotiert	1,5-3 nm	230-320 nm	550 – 650 nm

5 Weitere, im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete Substanzen mit ausgeprägter Lumineszenz sind Kristalle aus Cadmiumselenid, Cadmiumsulfid oder Zinksulfid, die mit Mangan, Kupfer bzw. Silber dotiert sind. Die diesen Substanzen eigene Lumineszenz wird durch Störungen im Kristallgitter hervorgerufen. Durch die Auswahl verschiedener Metallionen zur Dotierung (Ag, Cu, Mn) können unterschiedliche Emissionsspektren
10 erzeugt werden. Da die genannten Substanzen wasserunlöslich sind, werden sie erfindungsgemäß bevorzugt in Form sogenannter Mikropartikel („microparticles“) eingesetzt (s. z.B. Murase et al., J. Phys. Chem. B, 103: 754-760 (1999)). Die Eigenschaften einiger Vertreter dieser Substanzgruppe werden anhand der obigen Tabelle 1 am Beispiel von Mn²⁺ dotiertem ZnS verdeutlicht.

15

Weitere erfindungsgemäß geeignete Luminophore sind Erdalkalihalogenide mit Gitterfehlstellen, wie sie z.B. durch Dotierungen (Fremdionen) oder radioaktive Strahlung hergestellt werden können. Beispielsweise zeigen Partikel aus Calciumfluorid (CaF) durch eine entsprechende Dotierung mit z.B. Europium eine deutliche Lumineszenz. Bei
20 radioaktiv verursachten Gitterfehlern kann es z.B. im Falle von CaF auch zur Thermolumineszenz kommen, wobei bereits Temperaturen um 40 Grad Celsius ausreichen, um eine Lumineszenz auszulösen.

Die im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Verwendung bevorzugt
25 vorgesehenen fluoreszierenden Selten-Erden Metallverbindungen bzw. Chelate wie insbesondere die Europium-Chelate wurden aufgrund bestimmter Vorteile gegenüber herkömmlichen Fluorophoren als Marker für die zeitaufgelöste Fluorometrie ausgewählt. Die fluoreszierenden Europium-Chelate weisen große „Stokes-Verschiebungen“ (ca. 290 nm) ohne eine Überlappung zwischen den Exzitations- und Emissionsspektren auf und sind

durch ein sehr enges (10 nm Bandbreite) Emissionsspektrum bei ca. 615 nm gekennzeichnet. Ferner gestatten ihre langen Fluoreszenz-Halbwertszeiten (600 – 1000 μ s für Eu³⁺ im Vergleich zu 5 – 20 ns für herkömmliche Fluorophore) die Anwendung

5 zeitaufgelöster Fluoreszenz-messungen im Mikro- bis Millisekundenbereich, wodurch die oben erwähnten Hintergrundsignale wirksam reduziert werden können.

Tabelle 2

Metall-Ion (HWZ)	Zustand	Extinktion	Emission
Eu ³⁺ (600 μ s)	Microspheres	340-370 nm	610 nm
Tb ³⁺ (ca 1 ms)	NTA-Komplex	270 nm	545 nm
Pt ²⁺ (> 100 μ s)	Microspheres	390 nm	650 nm

NTA: 2-(Trifluoroacetyl)naphthalen, Molecular Probes

10

Die Verwendung von Europium-Chelaten als Marker im Rahmen einer zeitaufgelösten Fluorimetrie ist bereits seit längerem aus immunologischen Assays sowie aus Southern- und Western-Blot-Anwendungen bekannt. Die entsprechende Markierung des in einer zu untersuchenden Probe ggf. vorhandenen Biomoleküls (Ligand) kann anhand etablierter

15 Protokolle entweder mit Eu³⁺ oder einem Eu³⁺-Chelatbildner erfolgen (s. z.B. E.P. Diamandis und T.K. Christopoulos, „Europium chelate labels in timeresolved fluorescence immunoassays and DNA hybridization assays“, *Anal. Chem.* 62:1149A-1157A (1990)). Nach einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann der Analyt (Ligand) alternativ biotinyliert sein und die Detektion unter Verwendung von Eu³⁺

20 oder einem Eu³⁺-Chelatbildner erfolgen, welche an Streptavidin gekoppelt sind. Besonders bevorzugt hierbei ist die Verwendung sogenannter „Beads“, welche mit den entsprechend ausgewählten Selten-Erden Metallverbindungen beladen sind und auf diese Weise eine sehr hohe Dichte an Lumineszenz emittierenden Molekülen gewährleisten. Aus empirischen Versuchen ist bekannt, dass die Nachweisgrenze derartig optimierter

25 Fluorimetrie-Systeme bei ca. 1 bis 5 pg Protein oder DNA liegt.

Die meisten vorgenannten Farbstoffe sind nur für die Messung an oder in der unmittelbaren Umgebung der Zellen geeignet. Allerdings gibt es Verfahren um Zellmembranen für Farbstoffe und Reportermoleküle permeabel zu machen. Z.B.

5 Acetoxymethyl (AM) ester loading

Acid loading (insbesondere für Pflanzenzellen)

ATP-induzierte Permeabilisierung

Cationic liposome delivery

Electroporation

10 Hypoosmotischer Shock

Influx pinocytic cell-loading reagent

Ein geeignetes Beladesystem ist z.B. in "Delivery of Membrane-Impermeant Fluorescent Probes into Living Neural Cell Populations by Lipotransfer." K. Barber, et al. *Neurosci Lett*

15 207, 17 (1996) beschrieben.

Die aus der EP-A-0 881 490 bekannte Messeinrichtung zur Messung bestimmter physiologischer wie auch morphologischer Parameter mindestens einer zu untersuchenden lebenden Zelle kann für den erfindungsgemäßen Einsatz nach entsprechender Modifikation

20 verwendet werden. Die beschriebene Einrichtung weist bereits eine Vielzahl von Sensoren auf, die integraler Bestandteil einer Trägereinrichtung sind, auf welcher das zu untersuchende Material immobilisiert ist.

Die Trägereinheit der erfindungsgemäßen Vorrichtung besteht im wesentlichen aus einem

25 Halbleitermaterial mit einer integrierten, vorzugsweise mehrere Detektoren umfassenden optischen Detektorschicht, wobei als Detektoren vorzugsweise Photodioden eingearbeitet sind. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Signalverarbeitung zumindest teilweise innerhalb des Biosensors.

30 Nach einem Aspekt der vorliegenden Erfindung kann die zeitaufgelöste Fluoreszenz beispielsweise direkt auf dem Chip mit analogen Schaltungen ausgewertet werden, indem man nach Abschalten der Anregungsquelle z.B. jede Nanosekunde einen Wert aufnimmt,

der dann z.B. auch mit einem Referenzwert einer zuvor durchgeföhrten Messung, welcher ebenfalls auf dem Chip gespeichert wurde, verglichen wird. Darüber hinaus wird auf diese Weise ermöglicht, dass man unspezifische Störsignale wie z.B. die Eigenfluoreszenz von 5 gegebenenfalls anwesenden Systemkomponenten herausrechnen kann (s. auch Fig. 2). Geht man davon aus, dass man mittlerweile auch bis in den GHZ Bereich (< 1 ns) auflösen kann, so kann die Eigenfluoreszenz von der künstlichen Fluoreszenz unterschieden werden.

Sofern die Sensoroberfläche das Design einer Microarray-Anordnung aufweist, bei der eine 10 Vielzahl von Detektionsfeldern auszuwerten sind, kann die Detektion der Messfeld- bzw. - punktsignalwerte sequentiell erfolgen, indem z.B. ganze Zeilen oder Spalten der Sensoroberfläche bzw. Teile derselben nacheinander detektiert werden (Multiplexanwendung).

15 Beispielsweise können die elektronischen Ausgangssignale der Detektoren mittels geeigneter Schaltungseinrichtungen nach einer Analog-Digitalumsetzung einer externen Auswerteeinrichtung zugeführt werden. Als erfindungsgemäß geeignete optische Detektoren bzw. Sensoren kommen neben der Photodiode (pn, p-i-n, avalanche) CCD- Sensoren oder Photoleiter in Betracht, die vorzugsweise in Form einer Zeilen- oder 20 Arrayanordnung in das Halbleitersubstrat der Vorrichtung monolithisch eingearbeitet sind.

Photodioden können vorteilhaft im Rahmen einer zeitaufgelösten Lumineszenzmessung eingesetzt werden, da sie im Vergleich zu Photomultipliern eine geringe Detektionsfläche aufweisen.

25 Nach einem besonders bevorzugten Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Anregungsquelle integraler Bestandteil der Messeinrichtung und wird durch den Detektor selbst bereitgestellt. Die Wahl einer pn-Diode aus direktem Halbleitermaterial ermöglicht folgendes: Im ersten Fall bedeutet die Aktivierung die Anlegung einer Spannung, wodurch 30 ein Lichtsignal (pn-Diode wird als LED benutzt) ausgesendet wird, welches je nach Art und Beschaffenheit der pn-Diode in einem bestimmten Emissionswellenlängenband liegt und die Anregung eines im Bereich dieser pn-Diode gebundenen Liganden bewirkt. Nach

Deaktivierung der pn-Diode (pn-Diode wird als Photodiode benutzt) und nach Verstreichen einer gewissen Karenzzeit wird sie dann noch einmal aktiviert, um die gewünschte(n) Messung(en) durchzuführen.

5

Dadurch, dass die Anregungsstrahlung in der zuvor beschriebenen Ausführungsform über dieselbe Komponente eingekoppelt wird, mit der auch die Lumineszenzstrahlung aufgefangen wird, kann erreicht werden, dass selektiv ein sehr kleiner Bereich der Sensoroberfläche bzw. des Detektorfeldes bestrahlt wird und von diesem Bereich

10 ausgehende Lumineszenzstrahlung ausgewertet wird. Durch diese Vorgehensweise ist das untersuchte Detektorfeld sehr genau abzubilden und eine Störung der Messung durch Lumineszenz von außerhalb des untersuchten Bereichs kann verhindert werden.

15 Selbstverständlich können die Detektoren zusätzlich in Gruppen angeordnet sein, wodurch einzelne Detektionsfelder geschaffen werden, deren Eingangssignale ein zuverlässigeres Ergebnis gewährleisten als es bei einer Einzelbelegung pro Detektionsbereich der Fall wäre.

20 Durch eine Mehrfachbelegung pro Detektionsfeld kann auch eine messtechnische Zentrierung des Liganden-Bindungseignisses gewährleistet werden, was im Wege der Signalaufbereitung zu einer deutlichen Sensitivitätssteigerung beitragen kann.

25 Die Herstellung eines erfindungsgemäßen Sensors kann unter Anwendung des an sich bekannten CMOS(complementary metaloxide semiconductor)-Verfahrens erfolgen, weshalb alle Schaltungsbibliotheken für die Integration von Signalkonditionierung und Auswertung ohne Modifikationen verfügbar sind und im Rahmen der vorliegenden Erfindung implementiert werden können. Erfindungsgemäß ebenfalls geeignete Herstellungsverfahren sind z.B. NMOS-Prozesse oder Bipolar-Prozesse (s. z.B. S. Wolf, Silicon Processing for the VLSI ERA Vol.1, Lattice Press, Sunset Beach (1986)). Ferner 30 besteht die insbesondere nach Kostengesichtspunkten interessante Möglichkeit der Herstellung eines erfindungsgemäßen Biosensors auf der Basis von organischen Halbleitern (s. z.B. EP-A-1 085 319).

Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die einzelnen Detektionspunkte oder –felder voneinander in der Weise getrennt, dass im wesentlichen keine Lichtemission eines Punktes oder Feldes von dem oder den Detektoren eines anderen Punktes oder Feldes

5 empfangen werden kann. So können die einzelnen Detektionsorte in jeweiligen Vertiefungen angeordnet sein, wie sie zum Beispiel von üblichen Mikrotiterplatten bekannt sind. Bevorzugt sind erfundungsgemäß muldenartige Vertiefungen und solche, deren seitlichen Wandungen im wesentlichen senkrecht zur Oberfläche des Sensorchips angeordnet sind. Die jeweiligen Abmessungen einer solchen Vertiefung kann der

10 Fachmann in Kenntnis des Anwendungsbereichs frei wählen, solange sich der bzw. die Luminophoren des zu erwartenden Liganden/Rezeptor-Komplexes innerhalb der Vertiefung befinden und im wesentlichen kein Emissionslicht in benachbarte Vertiefungen eindringen kann. Eine besonders bevorzugte Vertiefung ist um mindestens 100nm in die Oberfläche der erfundungsgemäßen Vorrichtung eingesenkt. Der gleiche Effekt kann

15 alternativ erzielt werden, indem auf der im wesentlichen planaren Detektoroberfläche senkrecht nach oben gerichtete Trennmittel angeordnet sind, deren Abmessungen vom Fachmann in Kenntnis des gewünschten Anwendungsbereiches und der räumlichen Abmessung eines antizipierten Rezeptor/Liganden-Komplexes leicht ausgewählt werden kann. Die Anbringung entsprechend geeigneter Trennmittel kann beispielsweise durch

20 anodisches Bonden oder durch sogenannte Flip-Chip-Verfahren erfolgen. Ein derartiges System ermöglicht erfundungsgemäß ein sensorgestütztes elektrooptisches Bildaufnahmeverfahren.

In einer bevorzugten Ausführung sind auf dem Detektorchip Kanäle aufgebracht, so dass

25 auf einem Chip parallel mehrere verschiedene Analyte gemessen werden können. Die Kanäle können z.B. Reihen von Sensorelementen versorgen, auf denen die Arrays der Rezeptoren gebunden sind. So ließen sich z.B. Kalibrationsmessungen durchführen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird eine Parallelmessung von n identischen Arrays durchgeführt, um so die Kosten pro Analyse drastisch zu senken. Dazu wird der

30 Chip durch Mikrokanäle in beispielsweise 8 identische Kompartimente unterteilt.

Für den Fachmann ist klar, dass die Wahl des Detektors bzw. des Materials von der zu detektierenden Emissionswellenlänge des Farbstoffes abhängt. Grundsätzlich ist zu sagen, dass der Detektor aufgrund des sogenannten „Halbleiterbandgaps“ je nach Materialwahl

5 (z.B. Silizium oder Germanium) unterschiedliche Empfindlichkeiten bezüglich der Wellenlänge hat. Im bevorzugten Falle der Verwendung einer Silizium-Photodiode wird daher ein Empfindlichkeitsbereich geschaffen, der vom infraroten bis in das ultraviolette Wellenspektrum reicht, wobei die Empfindlichkeit zwischen diesen Bereichen am größten ist (s. z.B. B. Streetman, Prentice-Hall, Inc., „Solid State Electronic Devices“, ISBN 0-13-

10 436379-5, S. 201 – 227 (1995)).

Wenn man als Trägereinrichtung für die Rezeptoren und die Ausbildung der Sensoren ein monolithisch integrierbares Halbleitermaterial verwendet, lässt sich auch eine monolithisch integrierte Schaltung auf dem selben Substrat herstellen, wodurch in unmittelbarer Nähe

15 zum Untersuchungsobjekt (Rezeptor/Liganden-Komplex) eine Vorverarbeitung der elektronischen Sensor-Ausgangssignale erfolgen kann. Somit handelt es sich bei dieser bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung um eine „intelligente“ Sensoreinrichtung, die wesentlich mehr leistet, als rein passive Sensoren. Beispielsweise können die Ausgangssignale der elektrooptischen Sensoren durch eine mitintegrierte

20 Schaltung so aufbereitet werden, dass sie über Ausgangsschaltungen und Anschlusskontakte relativ problemlos nach außen geführt werden können. Ferner kann die Vorverarbeitung aus der Digitalisierung der analogen Sensorsignale und ihre Umwandlung in einen geeigneten Datenstrom bestehen. Des weiteren kann das signal-to-noise ratio (Signal-Rausch-Verhältnis) durch die in der erfindungsgemäßen Vorrichtung

25 verwirklichten Nähe des Detektors zum Ort der Signalverarbeitung aufgrund kurzer Signalwege sehr stark verbessert werden. Darüber hinaus sind auch weitere Verarbeitungsschritte möglich, mit denen z.B. die Datenmenge reduziert werden kann oder die der externen Verarbeitung und Darstellung dienen. Damit ist es möglich, dass die verbleibende Auswertung der optischen Signale und ihre Darstellung über einen Personal

30 Computer (PC) erfolgen kann. Ferner kann die erfindungsgemäße Vorrichtung so ausgestaltet sein, dass die vorzugsweise verdichteten bzw. aufbereiteten Daten über

Infrarot- oder Funkverbindung an entsprechend ausgestattete Empfangsstationen übermittelt werden können.

5 Die Steuerung der zugehörigen Einrichtungen auf dem Substrat kann über Steuersignale aus einer Steuereinrichtung erfolgen, die vorzugsweise ebenfalls ganz oder teilweise auf dem Substrat ausgebildet sein kann oder extern angeschlossen wird.

Die mögliche Auswertung der optischen/elektrischen Signale im Rahmen des
10 erfindungsgemäßen Verfahrens über einen handelsüblichen Computer hat den weiteren Vorteil, dass über geeignete Programme eine weitgehende Automatisierung der Datenauswertung sowie -speicherung möglich ist, so dass man im Rahmen der Datenanalyse durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung keinerlei Einschränkungen gegenüber mit Hilfe herkömmlicher externer Abbildungsoptiken
15 generierter Daten unterliegt.

Das direkte Erfassen der Lumineszenzen auf der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird dadurch realisiert, dass sich die für einen spezifischen Nachweis erforderlichen Signale direkt von Zellen geliefert werden, die sich auf dem Sensorbereich befinden. Eine
20 geeignete Beschichtung des Sensors mit einer Matrix, die das Zellwachstum fördert, ist dabei vorteilhaft.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform wird der optische Detektor in Form mindestens einer Photodiode bereitgestellt, wobei die Gegenwart einer Vielzahl dieser Photodioden
25 u.a. zum parallelen bzw. sequentiellen Nachweis mehrerer unterschiedlicher Analysen besonders bevorzugt ist. Aber auch bei Verwendung nur eines Farbstoffes bietet die Mehrfachanordnung den Vorteil, dass man durch mehrere Detektoren pro Detektionsfeld Profile aufnehmen kann, mit deren Hilfe sich die ortsspezifische Zuordnung eines Bindungseignisses von Rezeptor und Ligand im Wege der Zentrierung verbessern lässt.
30 Im Rahmen dieser speziell auf die als solche bekannten Mikroarray-Anordnungen gerichteten Ausführungsformen können die einzelnen Photodioden vorteilhafterweise zu definierten Detektionsgruppen bzw. Messfeldern zusammengefasst sein, wodurch die

Sensitivität der nachfolgenden Lumineszenzmessung sowie die Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit der hierdurch erhaltenen Messdaten signifikant erhöht werden.

- 5 Die Anregungsquelle, wie sie z.B. in Form einer oder mehrerer Weißlichtlampen, LED's, (Halbleiter)Laser, UV-Röhren, sowie durch Piezoelemente (Ultraschall) bzw. durch Lichtenergie abgebende Gase und/oder Flüssigkeiten (chemische Anregung) bereitgestellt werden kann, sollte ausreichend leistungsstark und vorzugsweise mit hoher Frequenz repetierbar sein. Letztere Eigenschaft ist dann gegeben, wenn die Lichtquelle sowohl
- 10 kurzzeitig aktiviert als auch gelöscht werden kann. Im Falle der Verwendung einer optischen Anregungsquelle sollte diese so abschaltbar sein, dass nach dem Abschalten im wesentlichen keine weiteren Photonen (wie z.B. durch Nachglühen) auf den Detektor treffen. Dies kann erforderlichenfalls beispielsweise durch Verwendung von mechanischen Verschlußblenden (engl. „shutter“), sowie durch Auswahl von LED's oder Lasern als
- 15 optische Anregungsquelle gewährleistet werden.

Vorzugsweise ist die Anregungsquelle mit der Vorrichtung optisch und mechanisch derartig mit den optischen Detektoreinheiten gekoppelt, dass ein Strahlungsfeld in Richtung der Optosensoren erzeugt wird, wobei der räumliche Abstand der

- 20 Anregungsquelle zur Detektionsebene möglichst klein ist. Der Abstand muss jedoch ausreichend sein, damit die für den bestimmungsgemäßen Einsatz erforderlichen Reaktionen zwischen Ligand und Rezeptor nicht beeinträchtigt werden. Dabei kann es zweckmäßig sein, dass die Anregungsquelle – entsprechend der Vielzahl vorgesehener Detektionsbereiche auf dem Substrat – aus einer Vielzahl von punktförmigen
- 25 Strahlungsquellen besteht, die mittels der Steuereinrichtung einzeln oder in Gruppen aktivierbar sind. Die Bestrahlung kann direkt, d.h. ohne eine zwischengeschaltete Optik erfolgen, wenn der von der Anregungsquelle ausgesandte Lichtstrahl bereits ausreichend stark fokussiert ist, um den insbesondere im Rahmen der Verwendung sogenannter Mikroarrays sehr kleinen Detektionsbereich zu gewährleisten. Alternativ kann der
- 30 Strahlungsgang aus der Anregungsquelle aber auch durch Verwendung geeigneter Linsen fokussiert werden, sofern dies z.B. durch eine sehr enge Belegung von Rezeptoren auf der

Sensoroberfläche angezeigt ist. Dem Fachmann ist klar, dass hierdurch ein weiteres Mittel zur Verringerung unspezifischer Störsignale wie z.B. Eigenfluoreszenz bereitgestellt wird.

- 5 Die Anordnung der punktförmigen Strahlungsquellen, die z.B. aus gebündelten Lichtleiterfasern oder aus miniaturisierten LED (Light Emitting Diode) bestehen oder auf andere Weise realisiert sind, ist zweckmäßigerweise zeilen- oder feldförmig und damit der Anordnung der Rezeptoren auf der Sensoroberfläche funktional angepasst. Für die Verwendung im Rahmen von Analysen unter Einsatz unterschiedlicher Selten-Erde
- 10 Chelate kann es vorteilhaft sein, dass die Anregungsquellen hinsichtlich der von ihnen abzugebenen Wellenlänge durchstimmbar sind oder Anregungsquellen für unterschiedliche Wellenlängen vorhanden sind. Des weiteren kann es für bestimmte Anwendungszwecke vorteilhaft sein, wenn die Anregungsquelle frequenz-moduliert wird. Hierbei wird intensitätsmoduliertes Anregungslicht eingesetzt, wobei die Modulation bei der Messung
- 15 von Halbwertzeiten im Nanosekunden-Bereich mit mehreren MHz erfolgt. Das dem Fachmann unter der Bezeichnung FLIM (engl. „Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy“) bekannte Verfahren ist daher im Rahmen einer weiteren erfindungsgemäß bevorzugten Ausführungsform eingeschlossen. Den vorhergehenden Ausführungen entspricht, dass auf der Sensorseite unterschiedliche oder durchstimmbare Sensoren für die
- 20 Erfassung der aus einem Rezeptor/Liganden-Komplex emittierten Lichtenergie vorhanden sein können. Sofern es sich hierbei um Photodioden handelt, werden entweder wellenlängenspezifische Photoelemente oder aber herkömmliche Photodioden ausgewählt, die mit aufgelegten, aufgebrachten, aufgedampften oder integrierten Wellenlängenfiltern ausgestattet sind. So ist z.B. bekannt, dass Siliziumnitrid im Gegensatz zu Siliziumoxid
- 25 UV-Licht nicht durchlässt, und dass Polysilizium UV-Strahlung absorbiert (s. z.B. V.P. Iordanov et al., Integrated high rejection filter for NADH fluorescence measurements, Sensors 2001 Proceedings, Vol. 1, 8 – 10 Mai, S. 106- 111, AMA-Service (2001)). Daher kann auf die Gateoxidschicht im Rahmen des üblichen CMOS-Prozesses Nitrid oder Polysilizium deponiert werden, wodurch auf der Photodiode entsprechende Filter
- 30 geschaffen werden. So hat z.B. NADH (Nicotinamid Adenine Dinucleotid) eine Anregungswellenlänge von 350 nm und eine Emissionswellenlänge von 450 nm. Durch Aufbringung eines Filters, der 350 nm ausfiltert, kann daher die Sensitivität erhöht werden.

Erfindungsgemäß kann dieser Effekt genutzt werden, um bei paralleler Verwendung von z.B. zwei unterschiedlichen Luminophoren, von denen beispielsweise nur einer Licht im UV-Bereich emittiert, eine differentielle Detektion zu ermöglichen, da die hierfür

5 vorgesehenen Detektoren UV-sensitiv ausgestaltet sind oder nicht. Ferner bietet dieser Effekt die Möglichkeit, gegebenenfalls störende Eigenfluoreszenzen anwesender Materialien mit bekannter Emissionswellenlänge durch Bereitstellung entsprechender Filter aus dem Messverfahren herauszunehmen. Ein Beispiel hierfür ist die parallele Verwendung von Europium-Chelaten (Emission bei ca. 620 nm) und mit Kupfer dotiertem Zinksulfid

10 (Emission bei ca. 525 nm), die durch hinreichend voneinander verschiedenen Emissionswellenlängenbereichen eine Zweifarbdetektion ermöglichen, z.B. innerhalb eines Bereichs eines Detektorpunktes bzw. -feldes, indem z.B. die eine Hälfte der Sensoren eines Detektorpunktes bzw. -feldes mit einem Tiefpassfilter und die andere Hälfte der Sensoren des gleichen Punktes oder Feldes mit einem Hochpassfilter ausgestattet ist.

15 Zusätzlich oder alternativ können unterschiedliche Luminophoren parallel eingesetzt werden, sofern ihre physikalischen bzw. optischen Eigenschaften hinreichend voneinander abweichen. Beispielsweise werden erfindungsgemäß die unterschiedlichen Anregungswellenlängen zweier zu verwendender Luminophore A und B und/oder deren

20 unterschiedlichen Halbwertzeiten genutzt. Dies kann z.B. durch Bereitstellung von zwei unterschiedlich dotierten Nanokristallen erfolgen.

Auf derart hergestellten Zellsensoren können nun unter Anwendung etablierter Verfahren Nachweise mit z.B. markierten Antikörpern durchgeführt werden. Positive

25 Detektionsereignisse können nun durch Zugabe von Farbstoffkonjugaten (Streptavidin /Avidin- Konjugate) nachgewiesen werden. Als Farbstoffkonjugate sind erfindungsgemäß besonders geeignet: Europium-, Terbium- und Samarium-Chelate, Microspheres („Beads“), die z.B. über Avidin-/Streptavidin mit Eu-, Sm-, Tb-Chelaten beladen sind, wobei sich die genannten Chelate durch ihre Eigenschaft auszeichnen, bei geeigneter

30 Anregung Lumineszenzlicht mit einer Halbwertszeit des angeregten Zustandes von über 5 ns abzugeben. Besonderes geeignet sind hierbei lumineszierende Microspheres, wie z.B. FluoSpheres Europium (Molecular Probes F-20883), da sie in der Lage sind, eine große

Zahl von Fluorochromen mit einem Bindungseignis zu immobilisieren. Erfindungsgemäß ferner geeignet sind Nanokristalle, wie sie z.B. von der Quantum Dot Corp. unter der Bezeichnung „Quantum-Dots[®]“ angeboten werden.

5

Nach dem Waschen zum Entfernen nicht gebundener markierter Liganden bzw. frei flottierender Lumineszenzfarbstoffe erfolgt die Messung der Bindung über eine geeignete Anregung und die Messung der zeitaufgelösten Fluoreszenz bei ausgeschalteter Anregungslichtquelle.

10

Erfindungsgemäß werden die Zeitdauer der Anregung mit T_1 , die Zeitdauer zwischen der Anregung und der Messung mit T_2 , und die Zeitdauer der Messung mit T_3 bezeichnet.

15

Das Zeitfenster T_3 für eine jeweilige, ggf. mehrfache Messung der Abklingzeit der Fluoreszenz sollte hierbei im Bereich von 5 ns bis 2 ms ausgewählt werden. Über die Auswahl von verschiedenen Selten-Erden Metallverbindungen mit jeweils unterschiedlich langen Abklingzeiten kann im Wege einer differenzierten Auswertung auch eine Zweifarbdetektion durchgeführt werden, was einer weiteren bevorzugten Ausführungsform entspricht.

20

Die Signale des Detektors werden durch eine Aufnahmeeinheit aufgenommen. Eine Aufnahmeeinheit besitzt einen sehr schnellen Konverter zur Umwandlung analoger Detektorsignale in digitale Werte, die gespeichert werden. Eine Auswertung der digitalen Werte wird vorzugsweise in Echtzeit vorgenommen, kann jedoch auch zeitlich verzögert erfolgen. Zur Auswertung der digitalen Werte kann ein gewöhnlicher Mikroprozessor verwendet werden.

30

Für den Fall, dass das Lumineszenzsignal für eine eindeutige Detektion zu schwach ist, kann im Rahmen einer bevorzugten Ausführungsform der Detektion eine Erhöhung der Nachwissensensitivität über eine Integration mehrerer Einzelmessungen erreicht werden. Dabei erfolgt eine identische Messung mehrfach und die Messergebnisse werden aufaddiert. Dies kann sowohl direkt auf dem Sensorchip als auch nach der Messung über

geeignete Software erfolgen. Eine Einzelmessung sieht beispielsweise folgendermaßen aus:

Während der Anregungszeit T_1 ist die Photodiode als Detektor in einem gegenüber dem Anregungszustand unempfindlichen Modus. Die Anregungsquelle ist während dieser Zeit

5 aktiv. Während der Zeitdauer T_2 sind sowohl die Anregungsquelle als auch die Photodiode inaktiv. Während dieser Zeit kann die Hintergrundlumineszenz abklingen. Während der Zeitdauer T_3 ist die Photodiode aktiv und detektiert ein bis mehrere einfallende Photonen der Luminophore. Durch Rücksetzen der Photodiode in den inaktiven Modus kann der Vorgang der Detektion wiederholt werden. Die jeweiligen Zeitintervalle können

10 beispielsweise mit 2 ms (T_1), 5 ns (T_2), und 2 ms (T_3) ausgewählt werden. Das Zeitintervall T_3 kann bei entsprechender Signalstärke auch deutlich kleiner als die Halbwertszeit des angeregten Zustandes des bzw. der eingesetzten Luminophore sein.

Nach einer besonders bevorzugten Ausführungsform der repetitiven Anregung werden die

15 im Zeitintervall T_3 erhaltenen Detektorwerte, gegebenenfalls nach Digitalisierung und weiterer elektronischer Bearbeitung, in Speicherzellen abgelegt, die einzelnen Zeitintervallen zugeordnet sind. Ein derartiger Speicher besitzt beispielsweise 100 oder mehr Speicherzellen, die aufeinanderfolgenden Zeitintervallen zugeordnet sind. Ein solches Zeitintervall liegt vorzugsweise im Bereich von 1 bis 100 Nanosekunden. Findet

20 die Detektion eines Lumineszenzprozesses beispielsweise 5 Nanosekunden nach Anregung statt, so wird für die Speicherzelle, die eine Zerfallszeit von 5 Nanosekunden mit umfasst, ein Wert gespeichert. Besonders bevorzugt kann das vom Detektor erhaltene Signal auch bezüglich der Signalintensität analysiert und festgestellt werden, von wie vielen Einzelmolekülen (Anzahl der Rezeptor/Liganden-Komplexe) das Signal ausgegangen ist,

25 wodurch nicht nur eine qualitative sondern auch eine quantitative Analyse ermöglicht wird. In der Speicherzelle wird nunmehr das der Luminophorzahl entsprechende Vielfache des Einheitswertes abgespeichert.

Der zuvor beschriebene Speicherprozess erfolgt für jede Einzelmessung erneut, wobei eine

30 Summation vorgenommen wird, sofern eine repetitive Anregung gewünscht ist. Das heißt, der nach einer Messung in einer bestimmten Speicherzelle abgespeicherte Einheitswert, oder ggf. ein Vielfaches davon, wird dem in der Zelle bereits vorhandenen Wert

zugeschlagen. Die Summenkurve, die auf diese Weise mit den Messungen für ein bestimmtes Detektorfeld erhalten wird, kann ausgewertet werden, um zu ermitteln, welche lumineszierenden Liganden im Detektorfeld gebunden sind. Auf die Summenkurven

5 können prinzipiell solche Auswerteverfahren angewandt werden, wie sie auch für Signalkurven eingesetzt werden, die mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Liganden erhalten wurden. Eine absolute Erfassung der Lumineszenzereignisse auf wenige Picosekunden genau erlaubt eine globale Analyse der Photonenstatistik. Es können charakteristische Häufungen oder Pausen in der globalen Photonenverteilung erkannt und

10 ermittelt werden. Es wird dadurch die Messung der Triplettdauer eines Systems sowie die Ermittlung von Reaktionskinetiken möglich. Ebenso lassen sich auf diese Weise Diffusionszeiten durch das Detektionsvolumen messen, die einen Rückschluss auf die Größe des Ligandenmoleküls ermöglichen. Mit einem solchen System kann eine Gesamt-Photonensammel-effizienz von 5 bis 10 % bezogen auf die eingestrahlte Photonenzahl

15 erreicht werden. Dies ergibt sich aus einer Absorptionseffizienz der Lumineszenzfarbstoffe von etwa 80 %, einer Emissionswahrscheinlichkeit von etwa 90 % und einer Detektorempfindlichkeit von bis zu 70 %.

Die Steuereinheit ist bei dieser Anwendung vorzugsweise darauf ausgelegt, die

20 Anregungsquelle für ein Zeitintervall T_1 zu aktivieren und nach Verstreichen eines Zeitintervalls T_2 den Detektor für ein Zeitintervall T_3 zu aktivieren. Eine derartige Steuereinheit ist geeignet, eine zeitaufgelöste Lumineszenzmessung zu ermöglichen. Das Zeitintervall T_1 , zu dem die Anregungsquelle aktiviert ist, dient dazu, Ligandenmoleküle in einen angeregten Zustand zu überführen, aus dem sie unter Aussendung von

25 Lumineszenzlicht in einen energetisch tieferen Zustand übergehen. Die Zeit T_1 liegt vorzugsweise im Bereich von 1 ns bis 2 ms. Die Karenzzeit T_2 dient dazu, spontane Lumineszenz der Probe, die nicht von den zu detektierenden Molekülgruppen ausgeht, aus der Messung auszuschließen. Vorzugsweise liegt die Zeit T_2 im Bereich zwischen 1 und 5 ns. Während des Zeitintervalls T_3 ist der Detektor aktiviert und empfängt vom

30 Rezeptor/Liganden-Komplex Lumineszenzstrahlung. Die Zeit T_3 wird vorzugsweise zwischen 5 ns und 2 ms gewählt. Während dieser Zeit T_3 werden die Detektorsignale bezüglich Signalhöhe und Zeitpunkt durch eine Aufnahmeeinheit aufgenommen. Sofern

die Messung an einzelnen oder zumindest sehr wenigen Molekülen durchgeführt wird, erhält man im Zeitintervall T_3 keine klassische Abklingkurve der Lumineszenz, sondern im Falle z.B. eines einzelnen Moleküls einen Signalpeak, der den Zeitpunkt bzw. das

5 Zeitintervall, in dem das individuelle Molekül Strahlung aussendet, kennzeichnet. Dadurch, dass die Messung wiederholt durchgeführt wird, kann eine statistische Auswertung erfolgen, aus der die Lumineszenzlebensdauer ermittelt werden kann.

Im Rahmen einer statistischen Auswertung können die Intensitäten summiert werden, die

10 10 in einem bestimmten Zeitintervall innerhalb T_3 erhalten worden sind. Dem Fachmann ist klar, wie er die Methode anwendet. Ergänzend wird auf die Ausführungen der WO 98/09154 hingewiesen.

Die Erfindung und vorteilhafte Ausgestaltungen werden nun anhand der Figuren der

15 15 Zeichnung näher erläutert:

Fig. 1 zeigt schematisch einen funktionellen Teilbereich einer erfindungsgemäßen Vorrichtung 1, welche im Rahmen eines CMOS-Prozesses hergestellt worden ist. Der optische Detektor, z.B. eine pn-Diode 2, ist überdeckt mit einem Isolator (z.B. Feldoxid),

20 und kann zusätzlich mit einem Filter 4 versehen sein. Der Kratzschutz 3 ist im Bereich des optischen Detektors bzw. des Detektorfeldes entweder scharfkantig oder stufenweise heruntergeätzt, so dass die Zellen 6 in einem vertieften Bereich angeordnet sind. Die nicht der eigentlichen Detektion dienenden Kratzschutz-Oberflächen des Sensorchips können durch Aufbringung von z.B. Edelmetall oder hydrophoben/hydrophilen Materialien 5

25 modifiziert sein.

Fig. 2 zeigt, dass man auf dem Sensorchip 1 erfindungsgemäß auch Detektoren bzw. Detektorfelder 2 vorsehen kann, die, wie im linken Teil der Darstellung angedeutet ist, nicht mit Zellen 6 bedruckt oder beschichtet sind. Das dient dazu, um Störsignale, wie sie

30 30 z.B. durch die Eigenfluoreszenz der Systemkomponenten verursacht werden können, aus dem spezifischen Detektionssignal zellulären Reaktion (rechter Teil der Darstellung) herauszurechnen.

In dieser Anordnung ist die Ausführungsvariante dargestellt, bei der die Oberfläche des Sensors 1 mit einer Abdeckung 7 bedeckt ist. Innerhalb der Abdeckung 7 befindet sich eine Substanz zum Naßhalten der Zelle 6 und gegebenenfalls weiterer Zellen oder Gewebe. Die 5 Abdeckung 7 enthält einen Zufluß 8 und einen Abfluß 9. Der Zufluß 9 ist mit einer Anregungsquelle 21 verbunden. Es handelt sich hierbei um eine chemische Anregungsquelle, die eine Substanz enthält, welche der in der Abdeckung 7 enthaltenen Flüssigkeit beigemischt wird. Diese Substanz kann zusammen mit dem in der Abdeckung 7 enthaltenen Gemisch durch den Abfluß 9 wieder abfließen oder abgesaugt werden. Die 10 Abdeckung 7, der Zufluß 8 und der Abfluß 9 können eine Flußzelle darstellen.

Fig. 3 zeigt, dass der erfindungsgemäße Sensorchip 1 mit mehreren Photodioden 2 pro Detektionsfeld ausgestattet sein kann, wobei jeder einzelne Detektor dieses Feldes denselben Rezeptor aufweist. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit einer 15 Mehrfachmessung für einen gegebenen Ligand/Rezeptor-Komplex, aus der eine statistische Abschätzung des spezifischen Messsignals abgeleitet werden kann. Beispielsweise wird hierdurch ermöglicht, dass zwischen unspezifischen und spezifischen Signalen differenziert werden kann.

20 Fig. 4 zeigt ein über mehrere Detektionsereignisse ausgedehntes Detektorarray, welches aus mehreren Photosensoren 2 bestehen kann. Mit dem Detektorarray können Ungleichheiten bei der Belegung der Oberflächen der erfindungsgemäßen Vorrichtung 1 mit den unterschiedlichen Zellen 6 ausgeglichen werden. Mit dem Detektorarray kann das Lumineszenzprofil einer Zelle 6 aufgenommen werden. Werden mehrere Zellen gemessen, 25 so können die verschiedenen Lumineszenzprofil der Zellen miteinander verglichen werden und beispielsweise ein mittleres Lumineszenzprofil bestimmt werden. Zusätzlich sind neben den Photosensoren 2 auch LED-Strukturen 20 aufgebracht oder in den Sensorchip 1 integriert. Diese liefern hier die Anregungsenergie für Lumineszenzereignisse.

30 Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert.

Herstellung eines erfindungsgemäßen Sensorchips

Der Sensor wird unter Verwendung von 6''(Inch) Wafern mit einem 0.5 μm CMOS-Prozeß gefertigt. Jede pn-Photodiode wird in einer n-Wanne auf p-Substrat angeordnet. Nach der

5 Feldoxidation folgen die Definition der p-Gebiete der Photodiode und die Aufbringung der 10 nm dicken Gateoxidschicht. Gewünschten-falls kann man an dieser Stelle zusätzlich noch strukturiertes Nitrid (z.B. LPCVD oder PECVD) als UV-Filter aufbringen. Dann erfolgt die Auflagerung und Strukturierung einer Siliziumdioxid-Schicht. Anschließend

10 werden die weiteren üblichen CMOS-Schritte durchgeführt, wie z.B. das Aufbringen einer Verdrahtungsschicht und die Oberflächenpassivierung (Kratzschutz).

Beschichtung des CMOS-Sensors

Der wie oben hergestellte CMOS-Sensor wird durch Beschichten mit einem geeigneten

15 Zellwachstumssubstrat, z.B. Gelatine modifiziert. Auf dieses Substrat werden dann vereinzelte Zellen (z.B. trypsinisierte Epithelzellen) ausgesät und mit Zellkulturmedium (z.B. DMEM-F12) zum Wachsen gebracht.

Markierung

20 Nach üblicher Fixierung und Permeabilisierung werden dem Chip immobilisierte Zellen mit einem Biotinmarkierten Anti-Cytokeratin Pan Antikörper markiert. Auf den Chip wird zur Färbung eine Markierungslösung gegeben, welche aus 5% BSA, 0,2% Tween 20 und 4x SSC-Puffer besteht und in welcher 0,001 % feste Microspheres (Europium Luminescence Microspheres, Neutravidin-beschichtet 0,04 μM , Molecular Probes F 20883) suspendiert sind. Die Reaktion wird für eine Zeitdauer von 30 Minuten unter Agitation mittels Taumler durchgeführt. Anschließend werden gegebenenfalls vorhandene, nicht gebundene Microspheres durch Waschen in 2 X SSC, 0,1 % SDS aus dem Ansatz entfernt.

Herstellung Anti-Digoxigenin-IgG beschichteter Micropsheres

0,04 μ M Fluospheres Platinum Luminescent Microspheres (F20886) werden mit einem monoklonalen Anti-Digoxigenin-IgG-Antikörper (Goat) nach der Vorschrift des 5 Herstellers (Molecular Probes) der Microspheres modifiziert. Die beschichteten Microspheres werden anschließend in einem Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 300.000 Daltons mit fünf Pufferwechseln gegen PBS dialysiert.

Beispiel der Autofloureszenz von Zellbestandteilen:

10 Bringt man belichtete Algenzellen vom Hellen ins Dunkle, so kann ein im Verlauf von einigen Minuten abklingendes dunkelrotes Nachleuchten (Wellenlänge 680nm bis 720nm) gemessen werden, die sogenannte verzögerte Fluoreszenz (engl. Delayed Fluorescence=DF). Dieses schwache Nachleuchten ist eine intrinsische Eigenschaft aller photosynthetisch aktiven Pflanzenzellen. Photosynthesegifte, verändern die Abklingkinetik 15 der verzögerten Fluoreszenz.

Beispiel Calciummessung mit Aqueorin:

Kultivierte Herzmuskelzellen werden mit Aqueorin durch osmotische Schockbehandlung beladen. Intrazelluläre Calciumsignale als Antwort auf chemische oder elektrische Reize 20 werden durch die Biolumineszenz des Aqueorins sichtbar gemacht und von dem Sensor aufgenommen. Eine Anregung mit Licht wie z.B. bei Europiumchelaten ist nicht notwendig. (Coeneterate Imaging $[Ca^{2+}]$; with Aequorin Using a Photon Imaging Detector." A.L. Miller, E. Karplus, L.F. Jaffe. Meth Cell Biol 40, 305 (1994)

25 Beispiel: Messung von Aktionspotentialen mit spannungsabhängigen Farbstoffen:

1. Beispiel: Extrazelluläres Detektieren von Aktionspotentialen:

Membranpotentialänderungen können auch außerhalb der Zelle nachgewiesen werden, falls man in unmittelbarer Umgebung der Zellen mißt. Hierzu gibt es Verfahren, die dies mit Elektroden oder Feldeffekttransistoren tun. Darüber 30 hinaus gibt es aber auch die Möglichkeit, mit sogenannten spannungssensitiven Farbstoffen zu arbeiten, die nicht in die Zelle eindringen. Hierbei ist Oxonole 781 zu nennen (Molecular Probes). Da dieser Farbstoff in die unmittelbare

Umgebung der Zelle vordringt können so die Membranpotentiale detektiert werden. Platziert man ein ganzes Array von Photodioden unter jeder Zelle eines Zelleverbundes so können damit Fortleitungen von Membranpotentialen verfolgt werden.

5

2.

3. Beispiel: Mit RH-Dyes können intrazelluläre Membranpotentialänderungen gemessen werden.

10 Das Monitoren von extrazellulären Signalen ist nicht nur bei Membranpotentialen von großer biologischer Bedeutung auch andere extrazelluläre Signale wie die Ansäuerung, Atmung, morphologische Veränderungen, Radikale, die von Zellen nach außen abgegeben werden sind biologisch wichtig. Z.B. kann die Abgabe von reaktiven Sauerstoffmetaboliten durch die Chemielumineszenzreaktion mit Coelenterazine bestimmt werden.

15

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 1. Vorrichtung zur ortsspezifischen Detektion eines Lumineszenzereignisses in oder an oder in der unmittelbaren Umgebung einer zu analysierenden Zelle (6) oder Zellverband oder Gewebe bestehend aus

10 (a) mindestens einer Oberfläche (4) der Vorrichtung, die zum direkten oder indirekten Ankoppeln von Zellen präpariert ist,

(b) mindestens einem optischen Detektor (2) zum Empfangen eines von der Umgebung der Oberfläche kommenden Lumineszenzsignals sowie

(c) mindestens einer Anregungsquelle (20, 21) zum Anregen von die Zelle umgebenden oder in der Zelle enthaltenen Ionen oder Molekülen in

15 Lumineszenzzustände,

dadurch gekennzeichnet,

20 dass die Oberfläche Teil eines Sensors ist, und der Detektor unterhalb der Oberfläche in dem Sensor integriert ist.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion mittels optisch angeregter Lumineszenz erfolgt.

25 3. Vorrichtung nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, die Detektion mittels zeitaufgelöster Lumineszenzmessung stattfindet.

4. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion mittels Chemolumineszenz, Elektrolumineszenz oder Biolumineszenz stattfindet.

30 5. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich auf den optischen Detektor ein Filter für die Anregungswellenlängen befindet.

6. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Veränderungen innerhalb oder ausserhalb von lebenden Zellen und / oder Geweben durch Lumineszenzdetektion untersucht werden.
5
7. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der optische Detektor eine Photodiode ist.
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der optische Detektor eine Vielzahl einzelner Detektoren umfasst, welche bevorzugt unter Ausbildung einzelner Nachweisfelder bzw. -raster in die Vorrichtung eingearbeitet sind.
10
9. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Zelle innerhalb einer Vertiefung der Oberfläche gemäß Anspruch 1 (a) und immobilisiert ist, wobei der hierdurch geschaffene Zell-Bindungsbereich gegenüber den Oberflächenbereichen ohne Zell-Bindungsbereich um mindestens 100 nm eingesenkt ist.
15
- 20 10. Verfahren zur ortsspezifischen Detektion des Vorhandenseins einer Lumineszenzreaktion in oder bei Zellen in einer zu analysierenden Probe auf der Grundlage der Messung zeitverzögerter Lumineszenz, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 in an sich bekannter Weise eingesetzt wird.
25

Zusammenfassung

EPO - Munich
22
27. März 2002

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein ein Verfahren sowie eine Vorrichtung zur
5 optophysikalischen Detektion von Analyten in oder an Zellen, insbesondere lebenden
Zellen. Insbesondere betrifft die Erfindung die Miniaturisierung vorbekannter Systeme,
bei denen die Detektion eines Analyten durch Lumineszenzmessung erfolgt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1/4

EPO - Munich
22
27. März 2002

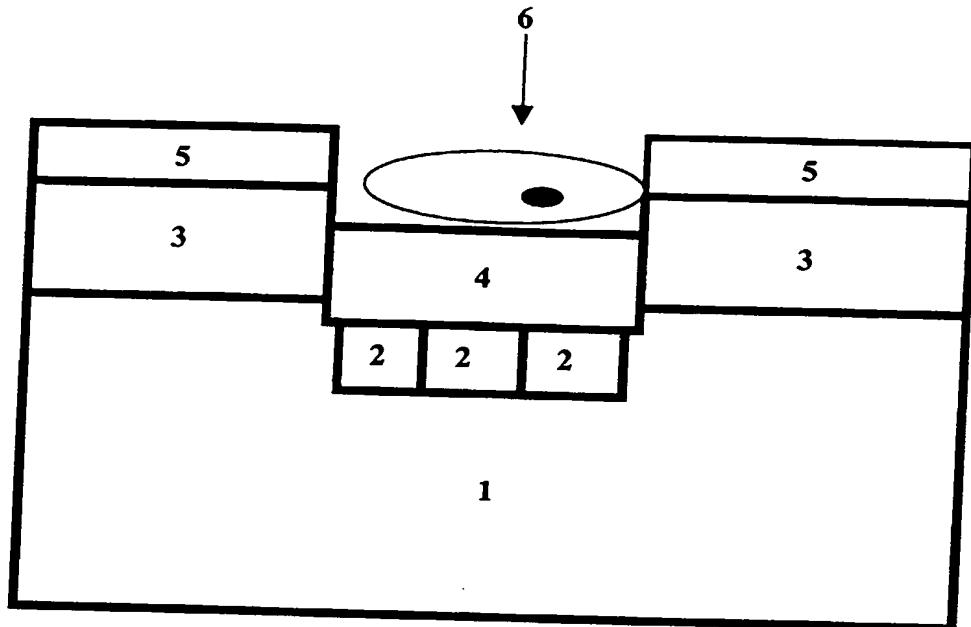


Figure 1

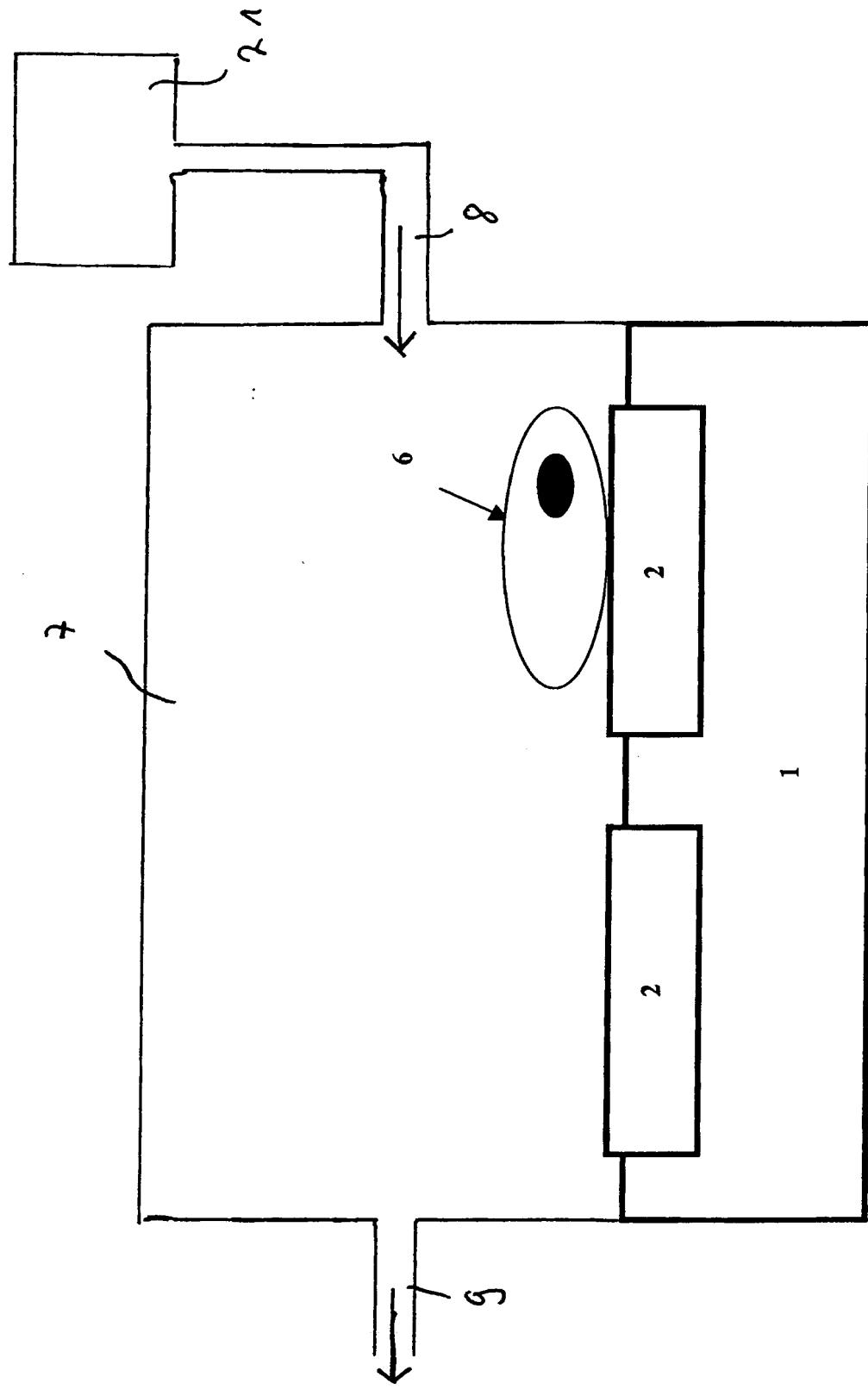


Figure 2

3/4

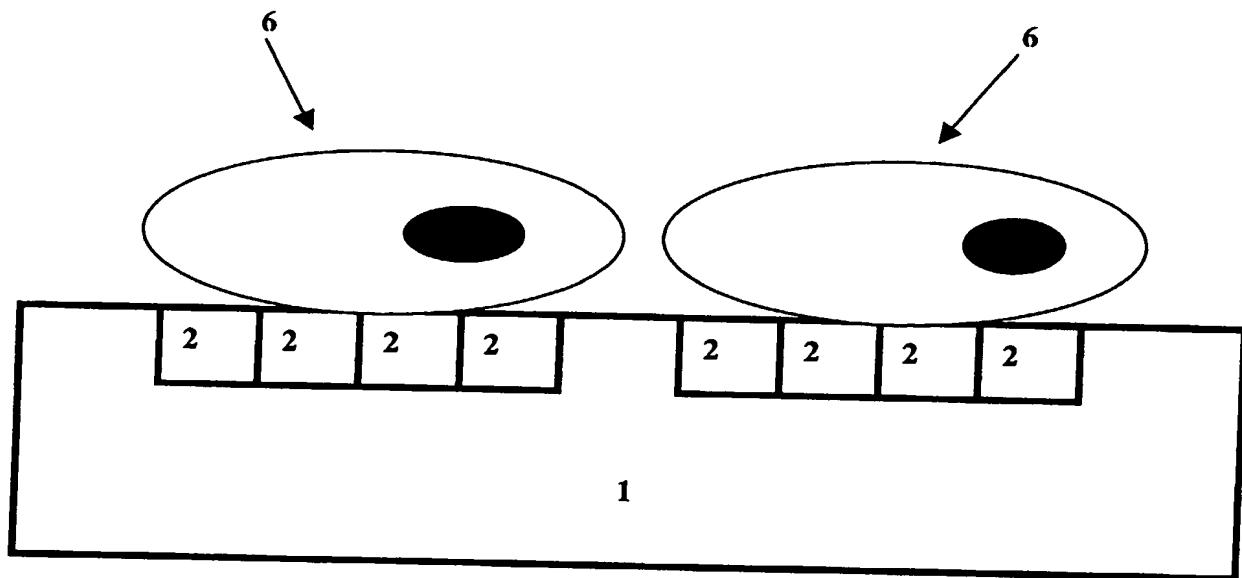


Figure 3

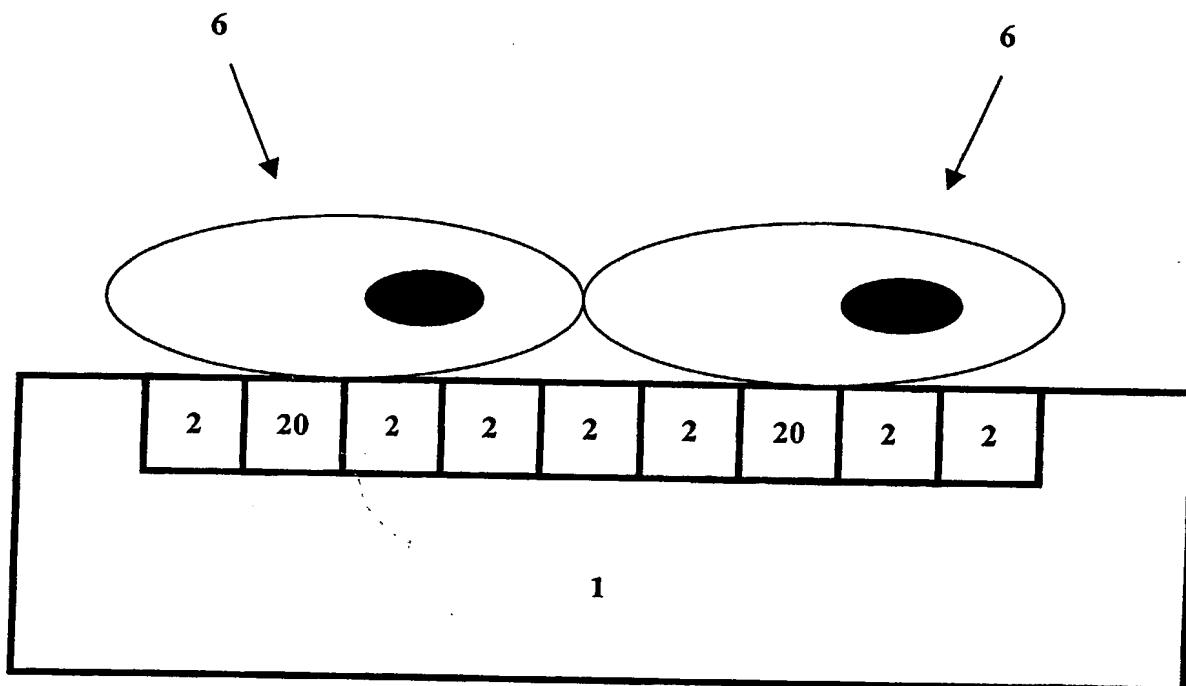


Figure 4